云　南　植　物　研　究　2000，22（2）：187～190
Acta Botanica Yunnanica

香荚兰成熟荚果中三种酶的活性测定*

江　明[1]，浦　帆[1]，谢文申[1]，胡运乾[1]，李　英[2]
（[1] 云南省香料研究开发中心，云南 昆明　650051）
（[2] 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明　650204）

摘要：不同级别的香荚兰（*Vanilla planifolia*）成熟荚果以及其中的种子和肉质果壳中的β-葡萄糖甙酶、过氧化物酶和多酚氧化酶的活性研究结果表明高等级的果荚中过氧化物酶活性高于低等级的果荚，种子中的β-葡萄糖苷酶活性几乎达到肉质果荚的2倍；过氧化物酶的活性主要分布在果壳中，没有在种子中测过氧化物酶的活性；多酚氧化酶的活性在测定样品极低，未能测出。

关键词：香荚兰；β-葡萄糖苷酶；过氧化物酶；多酚氧化酶；酶促生香
中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700(2000)02-0187-04

Activity of Three Enzymes in *Vanilla* Capsule

JIANG Ming[1]，PU Fan[1]，XIE Wen-Shen[1]，HU Yun-Qian[2]，LI Ying[2]
([1] *Yunmang Flavor and Fragrance Reserch & Development Center*，Kunming 650051)
([2] *Kunming Institute of Botany*，*The Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204)

Abstract：The bio-activity of three enzymes from *Vanilla* capsules，seeds and peels have been analyzed. The results show that the activity of β-glucosidase in seeds is much higher than that in peels. The activity of peroxidase in seeds is zero，but in peels it is at a high level. The activitiy of polyphenol oxidase in 5 samples are all at a very lower level.

Key words：*Vanilla planifolia*；β-glicosidase；Peroxidase；Polyphenol axidase；Enzyme treatment

香荚兰（*Vanilla planifolia* Andrews）是一种天然食用香料植物，属兰科香子兰属。其荚果经生香加工后具有浓郁纯正的香草香气，被广泛用于各类食品的加香。香荚兰果荚中的丰富香气主要源于果荚中的挥发性成分香兰素（vanillin），香兰素在未经加工的香荚兰新鲜果荚中是以β-葡萄糖苷的形式存在。Leong等（1989a）从未加工的香荚兰新鲜果荚中成功的分离和鉴定了葡萄糖苷香兰素（glucovanillin），随后又发现香荚兰中的另外3个与香荚兰香气有关的成分对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸和香兰酸均是以β-葡萄糖苷的形式存在，并成功的人工合成了这些成分（Leong等，1989b）。在未经杀青处理的成熟香荚兰荚果中添加外源β-葡萄糖苷酶可使上述成分的含量明显提高（Ranadive等，1992，浦帆等1998a，1998b），证明β-葡萄糖苷酶在香荚兰荚果的生香过程中起着重要的作用。

香荚兰荚果的传统生香方法是让荚果在一定的自然条件下由其自身的水解酶的水解作用

*收稿日期：1999-05-14，1999-10-15 接受发表

水解糖苷释放香气成分。因此，对香荚兰成熟果荚中各种内源水解酶的的活性与分布研究对于香荚兰荚果的生香加工技术；香荚兰的种植管理技术；采后生理学研究等均具有重要的意义，直接影响到香荚兰生产的产品品质和商业价值。本文对不同品质的成熟香荚兰荚果中的 3 种重要的内源水解酶的活性及分布进行了分析研究。

1 材料和方法

1.1 **材料** 材料取自于云南省西双版纳 1998 年成熟的新鲜荚果。1 号样品：一级香荚兰成熟新鲜荚果（长 18 cm 以上）；2 号样品：二级香荚兰成熟新鲜荚果（长 12～17 cm）；3 号样品：三级香荚兰成熟新鲜荚果（长 12 cm 以下）；4 号样品：一级香荚兰成熟新鲜荚果种的种子；5 号样品：一级香荚兰成熟新鲜荚果去除种子后的果肉。

1.2 **粗酶液的提取** 以上样品切碎后加入 1∶1（重量∶体积）的磷酸缓冲液（0.1 mol/L，1%MSH，pH6.5）于研钵中匀浆，在 25 000 r/min，4℃ 离心 20 min，取上清液为粗酶液保存于冰浴中备用。

1.3 β－葡萄糖苷酶的活性测定

1.3.1 **标准曲线** 以 NPGP（Nitophyenyl－β－D－glucophranoside）为底物，50 mmol/L 柠檬酸－磷酸缓冲液，pH 6.0，杏仁 β－葡萄糖苷酶（Sigma）为标准酶，60℃ 反应 30 min，加入 1 mol/L 的 $NaCO_3$ 终止反应，测定 A_{400} 的消光值，绘制标准曲线（图 1）（Malik & Singh，1980）。

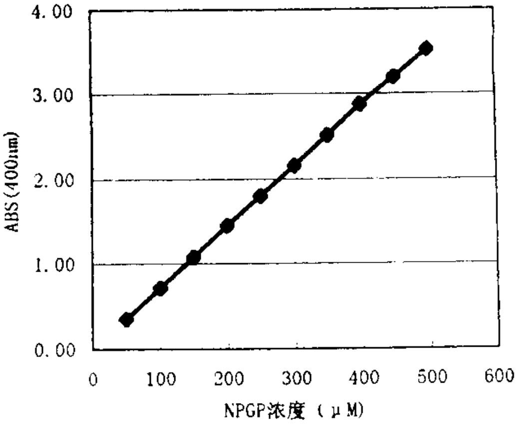

图 1 NPGP 标准曲线

Fig.1 Standard cure of NPGP

1.3.2 **β－葡萄糖苷酶的活性测定** 底物浓度为 NPGP200 μmol/L，β－葡萄糖苷酶提取液 5μL，60℃ 反应 30 min，加入 1 mol/L 的 $NaCO_3$ 终止反应，测定 A_{400} 的消光值（Malik & Singh，1980）。

1.4 过氧化物酶的测定

在 1 cm 的石英比色杯中加入 28～30 ℃ 温育的磷酸缓冲液（0.1 mmol/L，pH6.5）1.75 mL，粗酶提取液 0.1 mL，邻联（二）茴香胺溶液（1 mg/mL 的甲醇溶液）0.1 mL，加入

过氧化氢 0.2mL，在 28～30 ℃的反应条件下，测定 A430 的吸光值，每隔 30 s 记录一次变化值，记录 210 s（Malik & Singh，1980）。

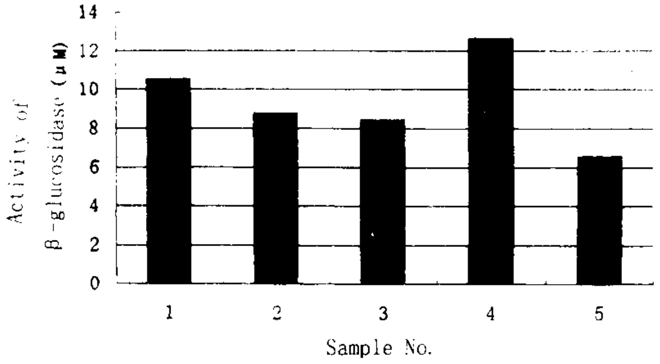

图 2　β－葡萄糖苷酶的活性测定　1. 一级荚；2. 二级荚；3. 三级荚；4. 种子；5. 果壳

Fig.2　The activity of β－glucosidase

1. First grade capsule；2. Second grade capsule；3. Third grade capsule；4. Seed；5. Shell

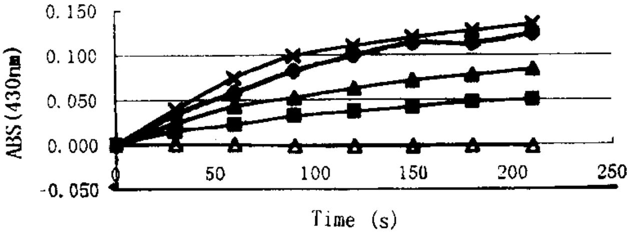

图 3　过氧化物酶的活性测定

●：一级荚；■：二级荚；▲：三级荚；×：果壳；△：种子

Fig.3　The activity of peroidase

●：First grade Capsude；■：Second grade capsule；▲：Third grade capsule；×：Shell；△：Seed

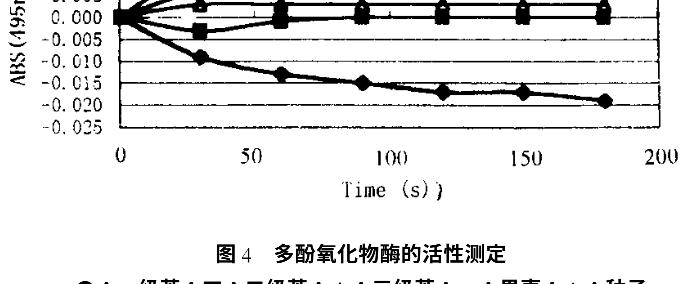

图 4　多酚氧化物酶的活性测定

●：一级荚；■：二级荚；▲：三级荚；×：果壳；△：种子

Fig.4　The activity of polyphenol oxidase

●：First grade capsule；■：Second grade capsule；▲：Third grade capsule；×：Shell；△：Seed

1.5 多酚氧化酶的测定

在 1 cm 的石英比色杯中加入儿茶酚缓冲液（0.01 mol/L 儿茶酚，新鲜配制的磷酸缓冲液 0.1 mol/L，pH6.5）1.50 mL，加入粗酶提取液 0.5 mL，立即翻转混匀，测定 A495 的吸光值，每隔 30 s 记录一次变化值，记录 180 s（Malik & Singh，1980）。

2 结果与讨论

β－葡萄糖苷酶的测定显示香荚兰成熟鲜果荚中的酶活性依次以一级荚果最高，三级荚果最低。特别值得注意的是荚果中的种子与果壳的测定结果，种子中的酶活性远远高于果壳，说明在香荚兰荚果中 β－葡萄糖苷酶主要存在于种子中（图 2）。

过氧化物酶的测定结果显示香荚兰成熟鲜果荚中的酶活性以一级荚果最高，三级荚果其次，二级荚果最低。与 β－葡萄糖苷酶的测定结果相反，过氧化物酶在香荚兰荚果中的分布主要在果壳中，种子中的测定结果为零（图 3）。

多酚氧化酶的测定结果显示香荚兰成熟鲜果荚中的酶活性在所以测定样品中都较低。除三级荚果的稍高一点外，其余均可视为零（图 4）。

以上的结果证明，在品质好的香荚兰荚果中各种与生香有关的酶活性均高与品质差的荚果。因此在香荚兰的栽培管理中要严格注意保证授粉充分，以获得生长健壮的一级果。

香荚兰的传统生香工艺过程很长，一般需要 3～6 个月，这可能是由于在生香过程中，通过杀青过程可使荚果中与生香有关的酶系激活，但位于种子中的酶由于种皮的束缚，不易释放出来，发挥有效的作用。因此，对于高等级的荚果在生香时为保持荚果的完整，应考虑适量添加外源的 β－葡萄糖苷酶，既可缩短生香时间，又可抑制霉菌的生长，减少损失降低成本。对不需保持荚果完整的低级荚果的生香，建议采取切段生香的处理工艺，这样可促进种子中的酶释放出来参与生香，加快生香的过程。同时，添加外源的 β－葡萄糖苷酶也是一种有效的方法。

参 考 文 献

浦帆，江明，1998a．香荚兰酶促生香的研究〔J〕．云南植物研究，**20**（3）：355～361

浦帆，张劲松，1998b．不同生香阶段香荚兰豆荚中糖苷水解成分的研究〔J〕．天然产物研究与开发，**10**（3）：29～33

Leong G，Uzio R，Derbesy M，1989a．Synthesis，identification and determination of glucosides present in green *Vanilla* beans〔J〕．*Flavor and Fragrance Journal*，**4**：163～167

Leong G，Archavlis，Derbesy M，1998b．Research on the glucoside fraction of the *Vanilla* bean〔J〕．*J Essent Oil Res*，**1**：33～41

Radnadive A S，1992．*Vanilla* and related flavor compound in *Vanilla* extracts made from beans of various global origins〔J〕．*Flavorand Fragrance Journal*，**8**：281～287

Malik C P，Singh M B，1980．Plant Enzynoligy and Histoenzynology〔M〕．New Delhi：Kalyani Publishers，53～72